

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-244997

(43) 公開日 平成5年(1993)9月24日

(51) Int.Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 Q 1/68

Z 8114-4B

審査請求 未請求 請求項の数3(全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平4-46687

(22) 出願日 平成4年(1992)3月4日

(71) 出願人 000005108

株式会社日立製作所

東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

(72) 発明者 佐々木 裕次

埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株式会社日立製作所基礎研究所内

(72) 発明者 原田 義則

埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株式会社日立製作所基礎研究所内

(74) 代理人 弁理士 小川 勝男

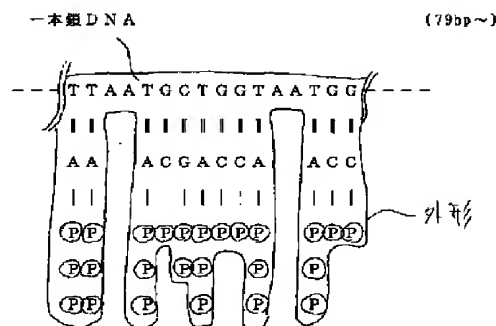
(54) 【発明の名称】 DNAまたはRNAの塩基配列決定法

(57) 【要約】

【目的】 各塩基に対して水素結合する標識分子で修飾した(水素結合標識法: HBL法) DNAまたはRNAの塩基配列を、SEM, STM, またはAFMを用いて、真空中、大気中、水溶液中で外形を直接観察する。

【構成】 目的のDNAまたはRNAに各塩基と直接水素結合する標識分子を添加し、結合させる。そして、上記の試料を平滑な基板の上に展開し、必要に応じて真空乾燥させてSEM, STM, またはAFMでDNAまたはRNAの外形を観察し塩基配列を決定する。

図1



記号の説明

= : 水素結合  
(P) : リン酸基  
A-(P)(P) : dATP --- 標識分子  
G-(P)(P) : dGDP --- 標識分子  
C-(P) : dCMP --- 標識分子

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】デオキシリボ核酸DNAまたはリボ核酸RNAの塩基配列を決定する方法において、これらを構成する各塩基種を水素結合を介して、塩基特異的な化学種で標識した後、DNAあるいはRNAの個々の塩基と化学種の結合状態の外形を観測することを特徴とする塩基配列決定法。

【請求項2】標識化学種として、DNAならば、アデニン、シトシン、グアニン、チミンのいずれかと、RNAならばアデニン、シトシン、グアニン、グリシンのいずれかと水素結合を形成する能力を有する化学種を使用することを特徴とする請求項1記載の塩基配列決定法。

【請求項3】観測手段として走査型電子顕微鏡、走査型トンネル顕微鏡または原子間力顕微鏡を使用することを特徴とする請求項1記載の塩基配列決定法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明はDNAまたはRNAの塩基配列の決定方法に関するもので遺伝子工学の分野における強い要請に応えることのできるものである。

## 【0002】

【従来の技術】DNAまたはRNAの分析手段として、たとえば、電気泳動を用いた塩基配列決定法（たとえば、マクサムーギルバート法や、ジデオキシ法など）が知られているが、この方法では、感度の最も高いラジオアイソトープを検出手段として用いた場合でも、一試行あたり1 pmole以上のDNAまたはRNAが必要である。また、工程が複雑で、解析に数時間以上かかる。従って、人間の全DNAまたはRNAの塩基配列のような膨大な塩基数を有するものには不向きである。また、ラジオアイソトープ法、蛍光法以外の塩基への標識法には、重原子標識法（S.L.Commerford, Biochemistry, 10, 1993(1971)参考）が知られているが、各塩基固有の標識法ではないため、塩基配列決定法としては、発展しなかった。また、この重原子標識法は、透過電子顕微鏡を用いるので、大気中、水溶液中での直接観察は、無理である。

【0003】走査トンネル顕微鏡（STM）、又は原子間力顕微鏡（AFM）を用いた核酸の塩基配列決定には、S.M.Lindsayらの電気電導度の差違を用いた方法（特開平3-198798）があるが、塩基特異的な標識法は、全く利用されておらず、配列決定には至っていない。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、DNAまたはRNAの塩基配列決定のために、水素結合標識法（Hydrogen bond Label: HBL法）という、核酸の特性を利用した簡便な操作による非破壊的な標識法とそれによる塩基配列決定法を実現することである。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明では、核酸の本質

的構造特性である相補的水素結合を利用した標識法（HBL法）を用いる。二本鎖DNAにおいて、塩基種の一つアデニンAはチミンTと、また、グアニンGはシトシンCとの水素結合により、2本の相補的一本鎖同士が結合している。

【0006】DNAは、二本鎖と一本鎖との間を可逆的に変化することができるので、試料を熱し、上記のA-T結合を解離させた（DNAの変性）後、アデニンAに対する標識分子として、チミンTの化学基を含有した化学種（例えば、チミジン三リン酸（TTP））を、先の変性DNAの再生（徐冷）中に溶液中に過剰に添加すると、A-T結合の再生ではなく、A-TTP結合が生じる。

【0007】従って、一旦、変性したDNAは、本来の二本鎖には戻らない。他の塩基（チミンT、グアニンG）にも同様に各塩基に特異的に水素結合し、かつ互いに形（特に分子の長さ）の異なる側基を持った標識分子、例えば、デオキシアデノシン二リン酸dADP、デオキシシトシン一リン酸dCMPを添加することで、T-dADP、G-dCMP結合を生じさせる。塩基配列決定の際は、塩基は四種類なので、標識化学種は、三種類で充分であり、この場合シトシンCは無標識でよい。さらにアデニンAを標識しない場合、チミンTを標識しない場合、あるいはグアニンGを標識しない場合のように、使用する標識化学種によって任意の組合せで特異的な標識が可能である。

【0008】標識分子に要求される要件は、アデニンA、シトシンC、グアニンG、チミンTの各塩基に安定に水素結合する化学種と、互いに形の異なる側鎖を持っていること、そして、標識分子の大きさが、隣の塩基に対する標識を空間的に阻害しないものであれば、特に限定されない。認識すべき塩基についての標識としては最も単純には、長さのことなるものとするのが良い。

【0009】しかし、HBL処理において、加熱処理を行う場合があるのでその熱的ダメージにより分子が破壊または一部結合が切断するようなものは、標識分子としては適さない。他にも例えば、ヌクレオチド的な構造を持っている補酵素や、上記の条件を満たす人工分子など観測手段の空間分解能以上の構造的差違をもって塩基毎に標識できる分子であれば標識分子になり得る。

【0010】標識は、一本鎖DNAに対してだけではなく、二本鎖DNAに対しても可能である。その場合、新たにHoogsteenタイプの水素結合が形成され、DNAは水素三本鎖DNAを形成することになる。

【0011】HBL処理して標識されたDNAは、走査電子顕微鏡（SEM）、走査トンネル顕微鏡（STM）、又は原子間力顕微鏡（AFM）でその形を直接観察する。DNAを構成する各塩基ごとに水素結合した形の異なる標識分子の外形が観察される。二本鎖DNAを試料とした場合、一般的には、二種類の被標識一本鎖D

3

NA分子が観測される。これらは互いに相補的なので、共に観測し、配列解析に供する。標識試料をSTM、あるいはAFMで観測する場合は、大気中、水溶液中でも観察できる。

【0012】HBL処理されたDNAは、実施例の中で示す通り、非常に特異的な外形をしているので、DNA以外のものと区別できる。

【0013】

【作用】本発明のHBL法は、水素結合を介して、化学種を各塩基に結合させ、その標識分子の固有の形（例えば、長さなど）を走査電子顕微鏡（SEM）、走査トンネル顕微鏡（STM）、又は原子間力顕微鏡（AFM）で直接観察するものである。また、HBL法は、可逆的な標識法なので、標識分子の取外しが可能であり、同一試料の再利用ができる。

【0014】直接観察であるHBL法では、試料量は、1fmole以下でも充分であり、既存の塩基配列決定法に比べ、極端に少なくて済む。

【0015】

【実施例】本発明をさらに詳細に説明するために以下に実施例を示す。しかし、本発明は、これに限定されない。

【0016】本実施例で用いたDNAは、 $\Phi$ X174(5386塩基対(bp))を、制限酵素HincIIで切断して生じた79bp断片を0.1nmole/mlに精製した(pH7.0)ものである。その水溶液10 $\mu$ l(DNAは1pmole)を、95℃まで加熱し、DNAを変性させた後、室温まで徐冷する。その際、75℃の時点で、予熱しておいたデオキシシトシン三リン酸dATP、デオキシシトシン二リン酸dGDP、及びデオキシシトシン一リン酸dCMPをDNAと同mole量が一桁多い程度添加する(HBL処理)。

【0017】修飾DNA溶液が室温になった状態で1.5 $\mu$ l(150fmole/ml相当)マイクロピペットで、雲母(金を200nm蒸着済)上に滴下し、真空乾燥させる。上記試料量は、本塩基配列決定法の試料量限界ではない。本決定法は、原理的に1本のDNAがあれば塩基配列決定が可能となる。上記濃度は、1cm<sup>2</sup>内に標識されたDNAがほぼ1層吸着する濃度であり、これにより観察が効率的に行えた。

【0018】本実施例で塩基の長さを79bpにしたのは、30nm $\times$ 30nm程度の視野の中にDNAの全体像を入れたかったためと、ヘアピン構造の形成など一本鎖DNA内での高次構造の形成をできるだけ防いで修飾されたDNAが2次的に展開しやすいようにしたためである。原理的には、かなり長い塩基を増幅処理せずに、そのまま標識することが可能である。

【0019】次に、上記サンプルの外形をSEM、STMまたはAFMで観察する。図1に模式的観察像を示す。図1に示す通り、デオキシシトシン三リン酸dATP、デオキシシトシン二リン酸dGDP、及びデオキシ

4

シトシン一リン酸dCMPの標識分子内にあるアデニンA、シトシンCおよびグアニンGの塩基部分の詳細な構造は区別がつかなくとも、これに続くりん酸基部分の長さの差は明確であるから、標識分子と相補的であるDNAの塩基を同定することができ、DNA塩基配列を直接決定できる。また、この時の一本鎖DNAと相補関係にある一本鎖DNAの標識状態を図2に示す。

【0020】図1、図2から明らかなようにDNAの塩基に対応して標識の長さが異なるから、これを観察すれば、容易に塩基の同定が出来る。

【0021】SEMによる観測は、基板とのコントラストを明瞭にするために低速(～1KeV)加速電圧で行った。また、さらに明瞭なコントラストを得るため試料に金属(白金)コーティングを施した。真空中、あるいは大気中でのSTM、AFM観測では、SEMと異なり試料表面を汚染することがなく、また、簡単にDNA像が得られる。特に、STMの場合は、DNAの膜厚が約3nm以上厚い場合は、測定が不可能となるが、AFMの場合は、DNAの膜厚が3nm以上厚い場合でも観測可能である。

【0022】図1の場合の塩基と標識分子の関係は、チミンTに対してデオキシシトシン三リン酸dATP、シトシンCに対してデオキシシトシン二リン酸dGDP、グアニンGに対してデオキシシトシン一リン酸dCMP、そしてアデニンAに対しては標識分子なしという組合せであったが、各塩基が区別されれば良いのであるから、他にも多くの組合せが考えられる。

【0023】以下に、もう1つの例を示す。図3では、アデニンAに対してのみ標識分子チミジン一リン酸TMPを結合させた。この例はある塩基種のための位置を確認することを目的にしたのである。この場合のように特定の塩基に対してのみHBL処理をすることも可能である。

【0024】

【発明の効果】本発明によれば、遺伝子のクローニングや増幅処理、さらには複雑な酵素処理や分析処理なしにDNAの塩基配列決定が可能になるので、人間のゲノム解析(ヒトゲノム解析)が、現行の方法(マクサムーギルバート法や、ジデオキシ法など)より、迅速化される。また、DNAまたはRNAの基本特性の学術的研究においても、汎用性のある(DNAにとって無害で、可逆的ラベル分子の使用)標識法として利用される。

【図面の簡単な説明】

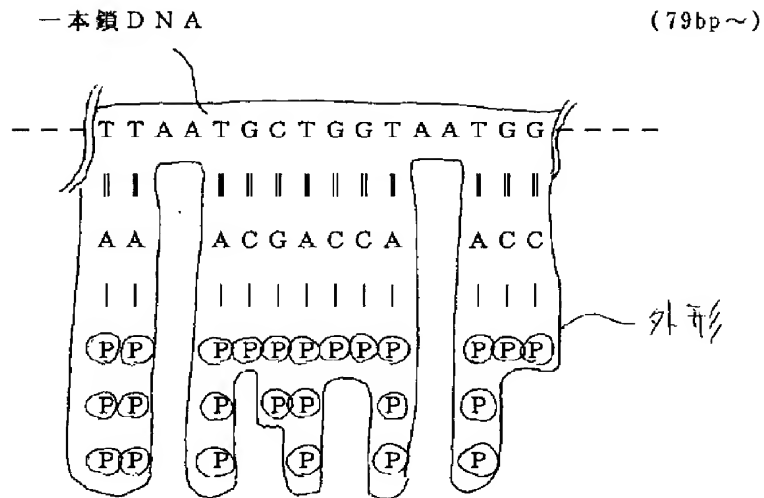
【図1】制限酵素HincIIで切断した $\Phi$ X174の79bp部分の一部にHBL処理を施したモデル図。

【図2】図1で示した一本鎖DNAと相補的なDNAにHBL処理を施したモデル図。

【図3】制限酵素HincIIで切断した $\Phi$ X174の79bp部分の一部に他の異なった形のHBL処理を施したモデル図。

【図1】

図1

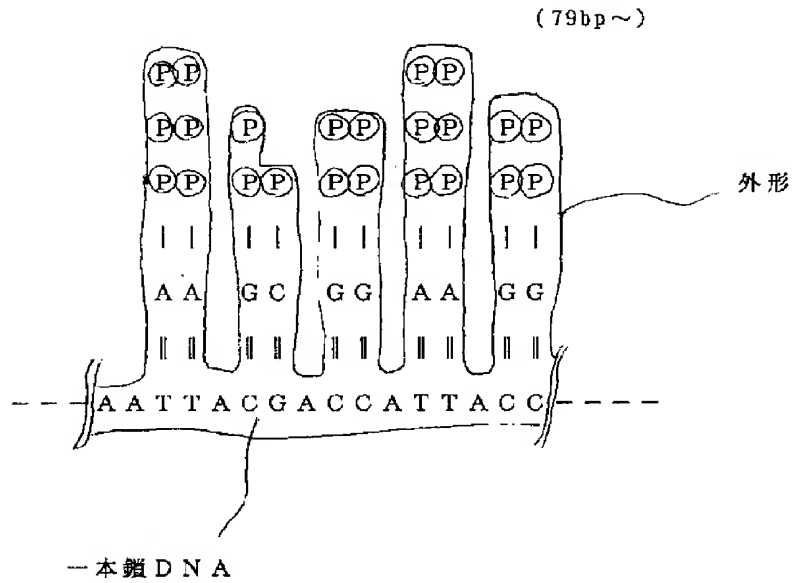


## 記号の説明

=	:	水素結合	
(P)	:	りん酸基	
A-(P)(P)(P):		dATP	-- 標識分子
G-(P)(P):		dGDP	-- 標識分子
C-(P):		dCMP	-- 標識分子

【図2】

図 2

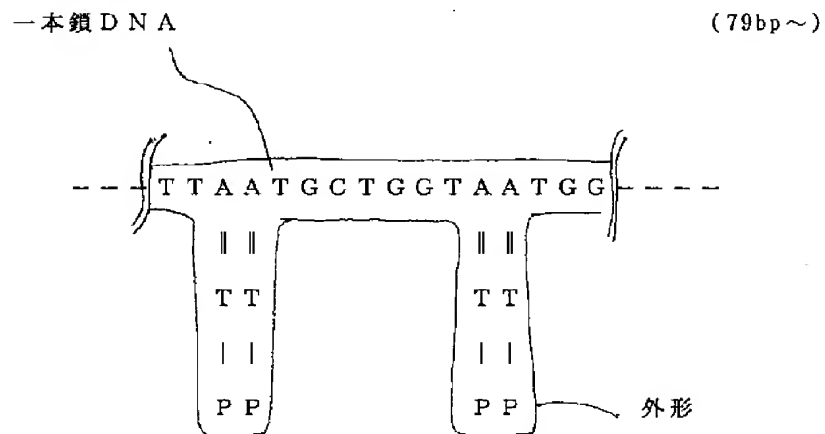


## 記号の説明

=	:	水素結合	
P	:	りん酸基	
A-(P)(P)(P):		dATP	-- 標識分子
G-(P)(P):		dGDP	-- 標識分子
C-(P):		dCMP	-- 標識分子

【図3】

図3



## 記号の説明

=	:	水素結合
P	:	りん酸基
T-P	:	TMP ー ー 標識分子